

**Asteraceae és Polygonaceae fajok biológiailag aktív másodlagos  
anyagcseretermékei**

Doktori értekezés tézisei

**Lajter Ildikó**

Szegedi Tudományegyetem  
Farmakognóziai Intézet

Szeged  
2015

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola  
Farmakognózia PhD program  
Programvezető: Prof. Dr. Hohmann Judit DSc.

**Farmakognóziai Intézet**

**Témavezetők: Prof. Dr. Hohmann Judit DSc.**

**Dr. Vasas Andrea PhD.**

**Asteraceae és Polygonaceae fajok biológiailag aktív másodlagos  
anyagcseretermékei**

Doktori értekezés tézisei

**Lajter Ildikó**

**Szigorlati Bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Máthé Imre DSc.

Tagok: Dr. Forgó Péter PhD., Prof. Dr. Péter Antal DSc.

**Bírálati bizottság:**

Elnök: Prof. Dr. Révész Piroska DSc.

Opponensek: Dr. Janicsák Gábor PhD., Dr. Szakonyi Zsolt PhD.

Tag: Dr. Vasas Gábor PhD.

Szeged

2015

## BEVEZETÉS

Napjainkban a fejlett országokban a daganatos illetve szív- és érrendszeri megbetegedések a halálozások okai között kiemelten magas gyakorisággal fordulnak elő. A tumoros és egyes kardiovaszkuláris betegségek (pl. ateroszklerózis) kialakulása gyakran összefüggésben áll krónikus gyulladásos folyamatokkal, amelyek számos betegség hátterében húzódnak meg. A klinikai gyakorlatban jelenleg elterjedten alkalmazott gyulladáscsökkentő szerek a szteroidok nagy dózisban vagy hosszabb időn át adva nem kívánt mellékhatásokat (magas vérnyomás, ödéma, fekély, súlygyarapodás és inzulin rezisztencia) idézhetnek elő. A gyulladásos betegségek kezelésében alkalmaznak nem szteroid gyulladáscsökkentőket (NSAID) is, amelyek kevesebb mellékhatással rendelkeznek. A kardiovaszkuláris betegségek kezelése számos indikációt foglal magába és ebből adódóan a kezelésre alkalmazható gyógyszerek is sokfélék, ide sorolhatók pl. a kardiotonikumok és antiaritmiás szerek, koleszterinszint- és vérnyomás csökkentők valamint a vérlemezke aggregációt gátló készítmények. Világszerte jelentős törekvések folynak új, szelektíven ható vegyületek keresésére.

A növények már régóta fontos szerepet játszanak az említett betegségek kezelésében. A jelenleg alkalmazott rákellenes gyógyszerek, köztük a vinblasztin, vinkrisztin, kamptotecin származékok, az etopozid és a paclitaxel, több mint 60%-a természetes eredetű. Egy karib-tengeri zsákállatból, az *Ecteinascidia turbinate*ból izolált trabektedin (Yondelis®), az első tengeri élőlényből előállított gyógyszer, amelyet az Európai Unió gyógyszerengedélyező hatósága is törzskönyvezett bizonyos tumoros megbetegedések kezelésére. Az ingenol-3-angelátot (Picato®) pedig, amely az *Euphorbia peplus* metabolitja, az aktinikus keratózis terápiájában alkalmazzák. Számos növényi eredetű anyagot, köztük flavonoidokat, kombretasztatinokat és a roszkovitint pedig jelenleg klinikai vizsgálatok különböző fázisaiban tesztelik.

A legismertebb természetes eredetű gyulladáscsökkentő a *Salix* fajokból izolált szalicilsav. A *Cannabis sativa* szekunder metabolitját, a kannabidiolt 2005 óta számos országban alkalmazzák gyulladásos betegségek kezelésére. Szemben a NSAID szerekkel, amelyek a COX enzimet gátolják, a szeszkviterpén-laktonok (SL) az NF- $\kappa$ B valamint a gyulladásos citokinek termelésének gátlásán keresztül hatnak, ezáltal a gyulladások kezelésében ígéretes vegyületeknek tűnnek.

Számos növényből nyert vegyületet (pl. izoflavonok, rezveratrol, kvercetin, katechin, tokotrienolok és karotinoidok) alkalmaznak napjainkban kardioprotektív céllal illetve a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatának csökkentésére. A különböző kémiai szerkezetű anyagok kardioprotektív hatása antioxidáns, koleszterinszint csökkentő, vérlemezke aggregációt

gátló, anti-iszkémiás, antianginás és gyulladáscsökkentő aktivitásukon keresztül alakul ki, így csökkentve a szív-érrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát.

A természetes anyagok széles szerkezeti és farmakológiai változékonyságuk miatt a gyógyszerkutatás számára rendkívül jelentősek. A modern izolációs technikák és szűrővizsgálati módszerek elterjedésével az új, ígéretes vegyületek száma jelentősen emelkedik és fokozódik az érdeklődés a népi gyógyászatban alkalmazott növényekkel kapcsolatban is. Az Asteraceae és Polygonaceae fajok szekunder metabolitjai biológiai aktivitásuknak, elsősorban antiproliferatív illetve gyulladáscsökkentő hatásuknak köszönhetően a gyógyszeripari fejlesztések ígéretes kiindulási vegyületei lehetnek, ezért a fajok szűrővizsgálata, valamint új, farmakológiai aktív vegyületeik izolálása rendkívül perspektivikusak.

## CÉLKITŰZÉSEK

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetében néhány évvel ezelőtt vizsgálatok kezdődtek az Asteraceae fajokban előforduló, a tumorsejtek szaporodását gátló hatású természetes vegyületek felkutatása céljából. Ennek keretében feladatom volt két kiválasztott Asteraceae faj részletes fitokémiai és farmakológiai analízise. A szűrővizsgálati program folytatásaként a Polygonaceae családjába tartozó növényfajok vizsgálatával foglalkoztam.

Munkám során célul tűztem ki:

- Az Asteraceae és Polygonaceae fajok fitokémiájával és farmakológiájával kapcsolatos szakirodalom áttekintését.
- A begyűjtött Polygonaceae fajok különböző polaritású oldószerekkel készített kivonatainak előállítását és azok daganatsejtek proliferációját illetve a G1RK csatornák működését gátló hatásának vizsgálatát.
- A *Neurolaena lobata* biológiai aktív szekunder metabolitjainak azonosítását: izolálás, szerkezet azonosítás, kivonatok és komponensek *in vitro* és *in vivo* antiproliferatív és gyulladáscsökkentő potenciáljának meghatározása.
- Az *Onopordum acanthium* fitokémiai és farmakológiai vizsgálatát: komponensek izolálása, szerkezet-meghatározása, valamint a növény kivonatainak és komponenseinek *in vitro* gyulladáscsökkentő hatásvizsgálata (beleértve a korábban a növény gyökeréből izolált vegyületek vizsgálatát).
- A *Polygonum persicaria* biológiai aktív komponenseinek izolálását és szerkezet-meghatározását, továbbá a különböző vegetációs állapotú és eredetű növényi minták analízisét LC-MS módszer segítségével.

## ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

A daganatellenes és GIRK csatorna gátló hatás szűrővizsgálatához a Polygonaceae fajokat virágzó állapotban, a Kárpát-medence különböző területeiről (Horvátország, Magyarország és Románia) 2010 júniusa és augusztusa között gyűjtöttük. A preparatív növénykémiai vizsgálathoz használt *N. lobata* föld feletti része Guatemala Chakmamantokrock területéről és a San Joséi Etnobotanikai Intézet botanikus kertjéből származott (2010 február). Az *O. acanthium* föld feletti részét 2008 májusában Kiskundorozsmán, a *P. persicaria* virágzó, föld feletti részét pedig 2010 júniusában Szarvas-Cserebökényen gyűjtöttük. Az LC-MS vizsgálathoz a különböző fenológiai állapotban betakarított *P. persicaria* minták Bélbor, Homoródalmás (Románia) és Szarvas-Furugy (Magyarország) területéről származnak (2012 júniusa és júliusa közötti gyűjtés).

A szárított növényi részeket metanollal perkoláltuk, majd a betöményített kivonatokat vízzel elegyítettük. Ezt követően először *n*-hexánnal/petroléterrel, majd kloroformmal/diklórmétánnal és végül etil-acetáttal (a *N. lobata* esetén) extraháltuk. A szűrővizsgálathoz a növényekből vizes kivonatokat is készítettünk.

A vegyületek tisztítását többlépéses kromatográfiás eljárás segítségével végeztük el, oszlopkromatográfiát (OCC), vákuum folyadékkromatográfiát (VLC), rotációs planárokromatográfiát (RPC), közepes nyomású folyadékkromatográfiát (MPLC), preparatív rétegekromatográfiát (PLC), gél-szűrést (GF) és nagy hatékonyságú folyadékkromatográfiát (RP-HPLC) alkalmazva. Állófázisként normál és fordított fázisú  $\text{SiO}_2$ -t,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -t vagy Sephadex LH-20 gél-t használtunk.

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása különböző spektroszkópiai módszerek (NMR, HRESIMS, APCIMS és EIMS) segítségével történt.

A szűrővizsgálatok során a Polygonaceae fajok kivonatainak antiproliferatív hatását 3 humán sejtvonalon [HeLa (cervix adenokarcinóma), MCF7 (emlő adenokarcinóma) és A431 (epiteliális eredetű bőrkarcinóma)] vizsgáltuk MTT teszt alkalmazásával. A növényi kivonatokat és a *P. persicaria* vegyületeinek G-fehérje kapcsolt befelé rektifikáló  $\text{K}^+$  csatornákra, u.n. GIRK csatornákra kifejtett hatását embrionális vesesejtvonalon teszteltük.

A *N. lobata* komponenseinek sejtproliferációt gátló hatását human sejtvonalakon (A2780 (petefészek carcinoma), A431, HeLa és MCF7) vizsgáltuk. A növény diklórmétános kivonatának és vegyületeinek vizsgálata során *in vitro* teszteltük a proinflammatorikus proteinek (IL-8 és E-szelektin) termelésére gyakorolt hatásukat LPS és TNF- $\alpha$  stimulációt követően, endotél (HUVECTert) és monocita sejtvonalakon (THP-1). A vegyületek esetében meghatároztuk az LPS és TNF- $\alpha$  által indukált IL-8 és E-szelektin mRNS expresszió gátlás mértékét is endotélsejteken. Ezen

kívül, vizsgáltuk a diklórmétános kivonat *in vivo* gyulladáscsökkentő hatását patkány lábödéma teszten.

Az *O. acanthium* kivonatainak és vegyületeinek (a növény gyökérből korábban izolált vegyületeket is beleértve) *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását COX-2 és NF- $\kappa$ B1 génexpresszió, valamint iNOS, 5-LOX, COX-1 és COX-2 enzimek gátlásán alapuló teszteken értékeltük. A komponensek citotoxicitását XTT teszt segítségével vizsgáltuk.

## EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### POLYGONACEAE FAJOK DAGANATELLENES ÉS GIRK CSATORNA GÁTLÓ HATÁSÁNAK SZŰRŐVIZSGÁLATA

A Polygonaceae család 27 fajának sejtprolifерációt gátló szűrővizsgálata során a *Fallopia* (3), *Oxyria* (1), *Persicaria* (2), *Polygonum* (8) és a *Rumex* (13) nemzetségbe tartozó növények kivonatainak *in vitro* antiproliferatív aktivitását mértük három humán sejtvonalon (HeLa, A431 és MCF7) MTT teszt segítségével. A különböző növényi részekből *n*-hexánnal (A), kloroformmal (B), metanol-víz elegyével (C) és vízzel készített kivonatokat (D) (n=196) 10 és 30  $\mu$ g/mL koncentrációban teszteltünk.

A 27 vizsgált növényből 6 faj mutatott 50 %-ot meghaladó proliferáció gátló hatást. 16 faj esetében csak mérsékelt (25–49.99%) sejtnövekedés gátlást tapasztaltunk, míg 5 faj hatástalannak bizonyult. A *Polygonum hydropiper*, *Rumex acetosa*, *R. alpinus*, *R. aquaticus*, *R. scutatus* és *R. thyrsoiflorus* kivonatai jelentős sejtnövekedés gátló aktivitást ( $\geq 50\%$ ) fejtettek ki 10 vagy 30  $\mu$ g/mL koncentrációban, egy vagy több sejtvonalon. Ezek a kivonatok többnyire a növények gyökeréből készültek, és elsősorban az A és B jelzésű lipofil extraktumok voltak hatásosak. A legjelentősebb aktivitást két faj a *R. acetosa* (77,67% és 97,02%, 10 és 30  $\mu$ g/mL koncentrációban HeLa sejtvonalon) és a *R. thyrsoiflorus* (96,20% és 88,55%, 30  $\mu$ g/mL koncentrációban, A431 és MCF7 sejtvonalakon) esetén tapasztaltuk, amelyek fitokémiai és farmakológiai vizsgálata jelenleg folyamatban van.

A *P. hydropiper*, *R. acetosa*, *R. alpinus* és *R. aquaticus* esetén a megfigyelt antiproliferatív hatás összhangban van a növények hagyományos, daganatellenes alkalmazásával. Más fajok, így az *Oxyria digyna*, *Persicaria amphibia*, *P. maculosa*, *Polygonum aviculare*, *P. bistorta*, *Rumex crispus*, *R. hydrolapathum* és *R. obtusifolius* mérsékelt hatásúnak bizonyultak annak ellenére, hogy a népi orvoslásban ezeket a fajokot rákos megbetegedések kezelésére használták. A két leghatásosabb faj, a *R. scutatus* és a *R. thyrsoiflorus* esetén sem farmakológiai sem fitokémiai vizsgálatokat nem közöltek a tudományos irodalomban.

A GIRK gátló hatás szűrővizsgálata során 11 faj, 51 kivonatának [*n*-hexános (A), kloroformos (B) és vizes-metanolos (C)] K<sup>+</sup> ioncsatornákra kifejtett aktivitását mértük 0,01 és 0,1 mg/mL koncentrációban embrionális vesesejteken. Elsősorban a kloroformos (B) kivonatok voltak a leghatásosabbak, közülük a *P. aviculare* (75 ± 5%), *P. amphibia* (70 ± 12%), *P. persicaria* (76 ± 8%), *R. stenophyllus* (72 ± 3%), *R. patientia* (74 ± 2%) és a *R. crispus* (72 ± 2%) 70%-ot meghaladó GIRK gátló aktivitást mutatott 0,1 mg/mL koncentrációban (nem publikált adatok). Munkánk során elsőként végeztünk szűrővizsgálatot növényi kivonatokkal a krónikus pitvarfibrillációt modellező GIRK K<sup>+</sup> ioncsatornákon.

#### **A *N. LOBATA*, AZ *O. ACANTHIUM* ÉS A *P. PERSICARIA* KIVONATAINAK BIOLÓGIAI AKTIVITÁSA**

Krupitza és mtsai vizsgálatainkat megelőzően a *N. lobata* különböző polaritású (vizes és szerves) kivonatainak sejtprolifерációt gátló és apoptózist indukáló hatását vizsgálták human promielocitás leukémia sejteken (HL-60). A legaktívabbnak bizonyult extraktumot ezt követően humán illetve egér eredetű anaplasztikus nagysejtes limfóma sejtvonalon (ALCL) tesztelték. A diklórmetános kivonat mindhárom sejtvonalon aktívnak bizonyult (IC<sub>50</sub> ~2,5, 3,7 és 2,4 µg/mL) és gátolta a sejtciklust a G2/M fázisban.

Az *O. acanthium* kivonatainak COX-2 és NF-κB1 génexpressziót valamint iNOS, 5-LOX, és COX-1 illetve COX-2 enzimek működést gátló hatását *in vitro* vizsgálatokban teszteltük. A legtöbb esetben a kloroformos kivonat mutatott jelentős gátló hatást [iNOS (76,67 ± 6,98%), 5-LOX (62,57 ± 6,84%), és COX-2 enzim gátlás (61,75 ± 8,98%)]. A különböző *P. persicaria* kivonatok GIRK csatornák működésére gyakorolt hatását automatikus patch clamp módszerrel teszteltük. A kloroformos kivonat 0,1 mg/mL koncentrációban, szignifikáns mértékben (76 ± 8%) gátolta a GIRK csatornák működését.

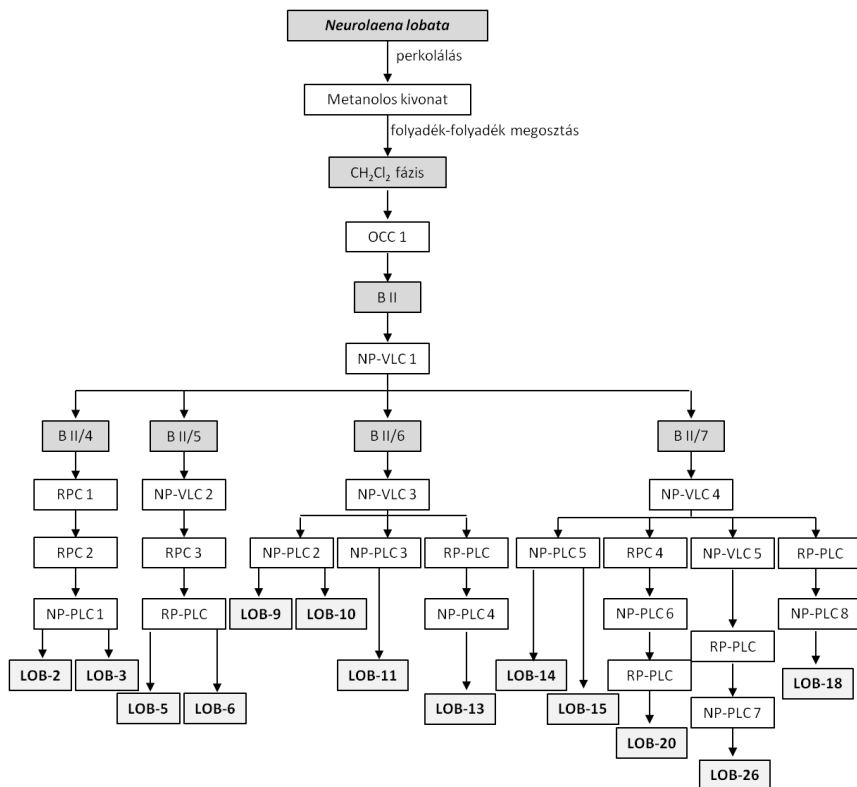
Az eredmények alapján a növények lipofil diklórmetános és kloroformos kivonatait választottuk ki, további részletes fitokémiai vizsgálatra, amelynek célja a biológiailag aktív vegyületek azonosítása és szerkezet-meghatározása volt.

#### **A *N. LOBATA*, AZ *O. ACANTHIUM* ÉS A *P. PERSICARIA* BIOLÓGIAILAG AKTÍV VEGYÜLETEINEK IZOLÁLÁSA**

A száraz növényi minták feldolgozásának első lépéseként metanolos perkolálást végeztünk szobahőmérsékleten, majd folyadék-folyadék megosztással kloroformos vagy diklórmetános fázisokat nyertünk, amelyeket különféle kromatográfiai technikák alkalmazásával frakcionáltunk, így jutottunk a tiszta komponensekhez.

## A *Neurolaena lobata* vegyületeinek izolálása

A *N. lobata* diklórmétános fázisának poliamid oszlopkromatográfiás frakcionálásával 7 főfrakciót (BI–BVII) nyertünk, amelyek közül farmakológiai szempontból a BII jelzésű volt a legígéretesebb (1. ábra). Mivel ez a frakció kémiaiailag rendkívül komplexnek bizonyult ezért a további elválasztásokat szelektívebb módszerekkel (VLC, RPC és PLC) szilikagél állófázison valamint eltérő polaritású és összetételű mozgófázisok alkalmazásával végeztük. Végző tisztításként NP- és RP-PLC elválasztást alkalmaztunk a vegyületek [LOB-2, 3, 5, 6, 9–11, 13–15, 18, 20 és 26, (1–13)] izolálására.

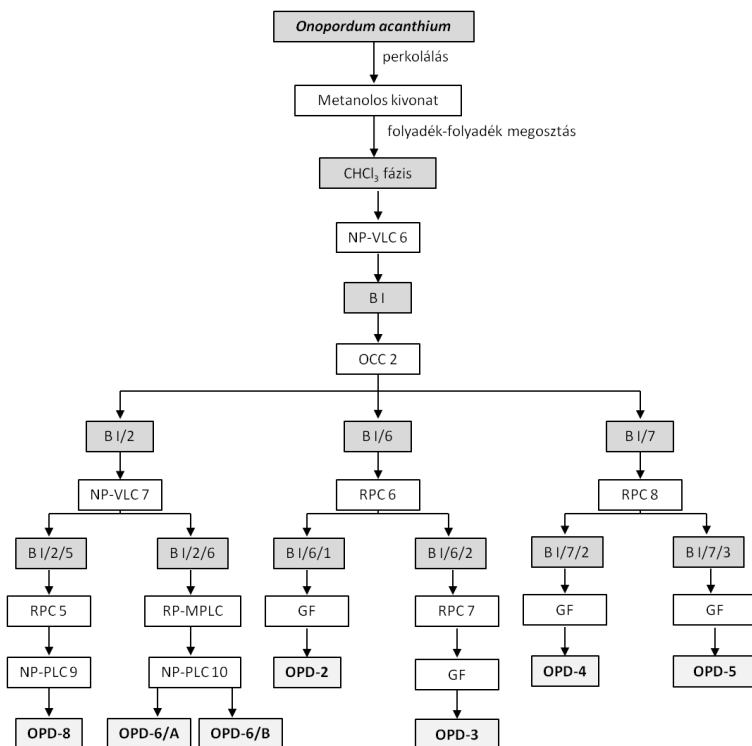


1. ábra A *N.lobata* vegyületeinek izolálása



## Az *Onopordum acanthium* vegyületeinek izolálása

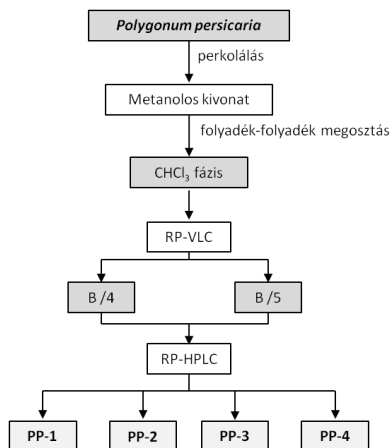
Az *O. acanthium* (szamárbogáncs) kloroformos fázisát folyadékkromatográfiával (VLC) frakcionáltuk szilikagél oszlopon, így 6 főfrakcióhoz (BI–VI) jutottunk (2. ábra). Ezt követően vizsgáltuk a frakciók COX-2 és NF- $\kappa$ B1 génexpresszióra gyakorolt, valamint iNOS, 5-LOX, COX-1 és COX-2 emzimeket gátló hatását *in vitro*. A BI, BIV és BV frakciók szignifikáns vagy mérsékelt aktivitást mutattak a COX-2 génexpresszió ( $45.48 \pm 8.34\%$ ,  $31.53 \pm 11.12\%$  és  $12.57 \pm 5.67\%$ ), az iNOS ( $62.52 \pm 16.52\%$ ,  $101.98 \pm 0.29\%$  és  $79.94 \pm 6.18\%$ ) és a COX-1 enzim gátlásában ( $63.8 \pm 9.8\%$ ,  $19.9 \pm 8.4\%$  és  $44.9 \pm 8.8\%$ ). A BI frakciót ezután poliamid oszlopon frakcionáltuk, amellyel további 7 frakciót nyertünk (BI/1–I/7). A legaktívabb BI/2, BI/6 és BI/7 frakciók tisztítását többlépéses kromatográfiai módszerrel (VLC, RPC, MPLC, GF és PLC) végeztük, szilikagél és Sephadex LH-20 állófázist alkalmazva. Ily módon 7 vegyületet izoláltunk [OPD-2–5, 6/A, 6/B és 8, (14–20)].



2. ábra Az *O. acanthium* vegyületeinek izolálása

### A *Polygonum persicaria* vegyületeinek izolálása

A *P. persicaria* (baracklevelű keserűfű) kloroformos fázisát folyadékkromatográfiával frakcionáltuk fordított fázisú szilikagél oszlopon (3. ábra). Az elválasztás 6 főfrakciót (B/1-B/6) eredményezett, amelyeknek ezt követően teszteltük GIRK-gátló hatását. A vizsgálat során a B/4 és B/5 frakciók jelentős aktivitást mutattak. A frakciók tisztítására RP-HPLC elválasztást alkalmaztunk, amellyel 4 vegyületet (PP-1–4, 21–24) nyertünk.



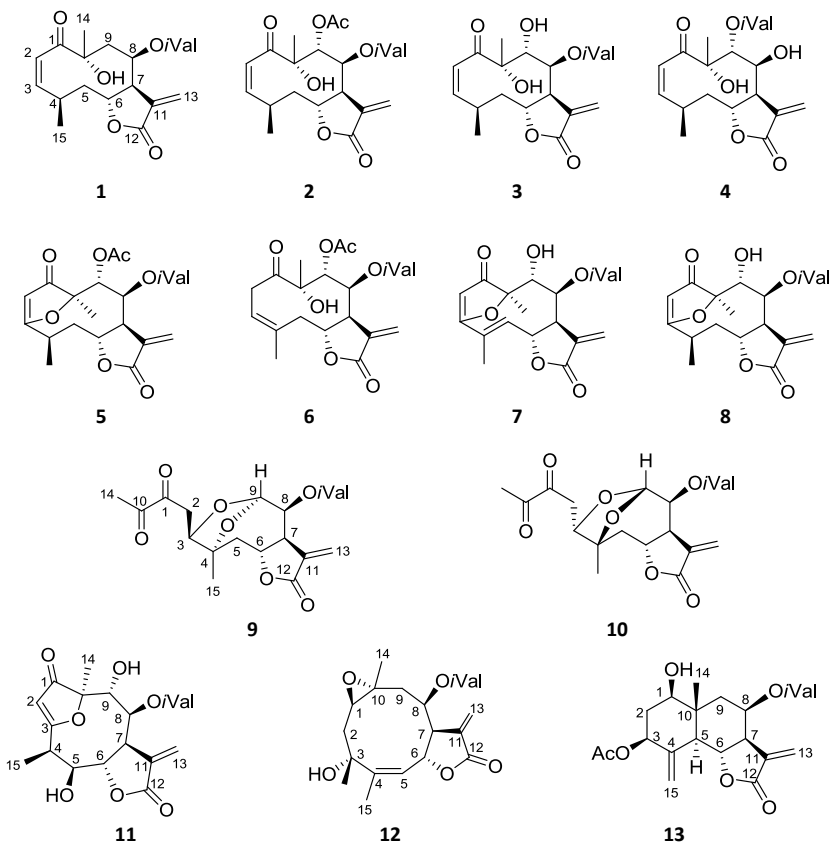
3. ábra *P. persicaria* vegyületeinek izolálása

### AZ IZOLÁLT VEGYÜLETEK SZERKEZET-MEGHATÁROZÁSA

Az izolált vegyületek szerkezet-meghatározása spektroszkópiai módszerek segítségével történt. A tömegspektrometriás vizsgálatokkal a molekulatömeget és az összegképletet határoztuk meg, az UV spektroszkópiai és az optikai forgatóképesség mérésekkel pedig további fontos információkat nyertünk. A szerkezet-meghatározáshoz az 1D és 2D NMR spektroszkópia szolgáltatta a legértékesebb adatokat. Az  $^1\text{H}$  NMR, JMOD,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HSQC és HMBC spektrumok alapján levezettük a vegyületek síkbeli szerkezetét, majd a NOESY korrelációk segítségével meghatároztuk a molekulák relatív konfigurációját. Az NMR vizsgálatok eredményeként elkészítettük az új vegyületek és néhány ismert vegyület jellemzésére szolgáló teljes  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendelést.

### A *Neurolaena lobata* vegyületei

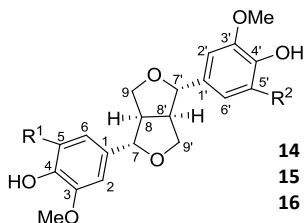
A *N. lobátából* 13, a 8-as vagy 9-es (**LOB-6** esetében) helyzetben izovaleriánsavval észterezett szeszkviterpén-laktont izoláltunk. Ezek közül nyolc ismert germakranolid [**LOB-2** (neurolenin A, **1**), **LOB-3** (neurolenin B, **2**), **LOB-5** (neurolenin D, **3**), **LOB-6** (neurolenin C, **4**) és **LOB-10** (lobatin A, **6**)], illetve furanoheliangaloid [**LOB-11** (lobatin B, **7**), **LOB-9** (8 $\beta$ -izovaleriloxi-9 $\alpha$ -acetoxi-kalikulatolid, **5**) és **LOB-13** (8 $\beta$ -izovaleriloxi-9 $\alpha$ -hidroxi-kalikulatolid, **8**)] típusú vegyület. A **LOB-15** (**9**) és **LOB-14** (**10**) szokatlan szeko-germakranolid, amely egy biciklusos acetál részt tartalmaz. A **LOB-18** (**11**) a **LOB-13**-hoz (**8**) hasonlóan 1-keto-furanoheliangaloid származék, a két vegyület mindössze a C-5 szubsztitúciójában tér el egymástól.



A **LOB-20 (12)**, a dezacetil-izovaleril-heliangin 3-epimerje, szintén egy telítetlen epoxi-germakranolid észter. A két vegyület esetén mindössze a H-3 csatolási állandójában mutatkozott különbség. Eudezmanolid típusú SL-ok széles körben előfordulnak az Asteraceae család fajaiban, azonban a **LOB-26 (13)** az első vegyület, amelyet a *Neurolaena* nemzetségben azonosítottak. A **LOB-15** (neurolobatin A, **9**), **LOB-14** (neurolobatin B, **10**), **LOB-18** (5β-hidroxi-8β-izovaleroiloxi-9α-hidroxikalikulatolid, **11**), **LOB-20** (3-*epi*-dezacetilizovaleroilheliangin, **12**) és **LOB-26** (3β-acetoxi-8β-izovaleroiloxirejnosin, **13**) jelzésű vegyületeket új szeszkviterpén-laktonokként azonosítottuk.

#### Az *Onopordum acanthium* vegyületei

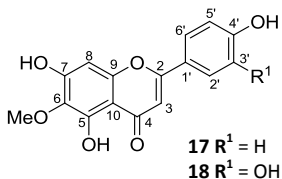
Az *O. acanthium*ból izolált vegyületek közül 3 lignán, 4 pedig flavonoid típusú. A komponensek [**OPD-8** ((+)-pinorezinol, **14**), **OPD-6/A** ((±)- sziringarezinol, **15**), **OPD-6/B** (mediorezinol, **16**) , **OPD-2** (hiszpidulin, **17**), **OPD-3** (nepetin, **18**), **OPD-4** (luteolin, **19**) és **OPD-5** (apigenin, **20**)] azonosítása az általunk mért illetve korábban közölt NMR és MS adatok összehasonlításával történt. Az **OPD-8 (14)** esetében kiegészítettük irodalomban közölt NMR adatokat és elkészítettük a teljes  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendelést. Az izolált metabolitokat a luteolin (**19**) és az apigenin (**20**) kivételével elsőként mutattuk ki a növényből, a mediorezinolt (**16**) pedig elsőként detektáltuk az *Onopordum* nemzetségben.



**14**  $\text{R}^1 = \text{H}$ ;  $\text{R}^2 = \text{H}$

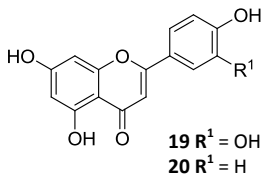
**15**  $\text{R}^1 = \text{OMe}$ ;  $\text{R}^2 = \text{OMe}$

**16**  $\text{R}^1 = \text{OMe}$ ;  $\text{R}^2 = \text{H}$



**17**  $\text{R}^1 = \text{H}$

**18**  $\text{R}^1 = \text{OH}$



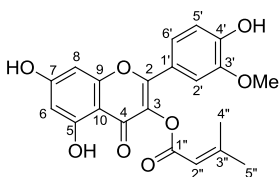
**19**  $\text{R}^1 = \text{OH}$

**20**  $\text{R}^1 = \text{H}$

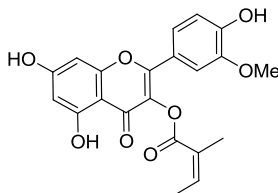
### A *Polygonum persicaria* vegyületei

A *P. persicaria* esetén 4 flavonoidot izoláltunk, köztük a 3-as helyzetben észterezett **PP-1 (21)** és **PP-2 (22)** jelzésű vegyületeket. A **PP-1** ritka szenecionil, míg a **PP-2** angeloil-csoportot tartalmaz. Szenecionil-csoportot tartalmazó vegyületek előfordulása nagyon ritka a növényvilágban. A **PP-3 (23)** és **PP-4 (24)** 6,7-metiléndioxi-flavonoid származék. Jellegzetességük, hogy 4 illetve 5 metoxicsoporttal szubsztituáltak. A **PP-1** (3-*O*-szenecionil-izoramnetin, **21**), **PP-2** (3-*O*-angeloil-izoramnetin, **22**), **PP-3** (5,3',4',5'-tetrametoxi-6,7-metiléndioxi-flavon, **23**) és **PP-4** (3,5,3',4',5'-pentametoxi-6,7-metiléndioxi-flavon, **24**) új természetes anyagok, a **PP-4** jelzésű anyagot korábban szintetikumként közölték.

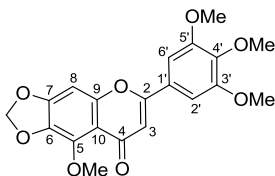
A különböző területekről eltérő fejlődési fázisban begyűjtött *P. persicaria* minták LC-MS vizsgálata során megállapítottuk, hogy az izolált flavonoidokat (**21–24**) csak a virágzási stádiumban betakarított minták tartalmazzák.



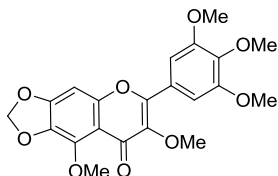
**21**



**22**



**23**



**24**

### BIOLÓGIA AKTIVITÁS

#### *Neurolaena lobata*

A *N. lobata* esetén vizsgáltuk az aktív diklórmetános kivonatból izolált új szeszkviterpén-laktonok (**9–13**) antiproliferatív hatását humán tumoros sejtvonalakon (A2780, A431, HeLa és MCF7). A **11**-es jelzésű vegyület kivételével valamennyi anyag gátolta az A431 és A2780 sejtek proliferációját, a másik két sejtvonalon (MCF7 és HeLa) azonban kevésbé aktívnak mutatkoztak. A **10**, **12** és **13** vegyületek esetén az A431 ( $6,8 \pm 0,56 \mu\text{M}$ ,  $7,2 \pm 0,99 \mu\text{M}$  és  $5,3 \pm 0,47 \mu\text{M}$ ) és MCF7 ( $7,2 \pm 0,57 \mu\text{M}$ , **12**) sejtvonalakon mért  $\text{IC}_{50}$  értékek összemérhetőek voltak a referencia anyagként használt

ciszplatinével ( $8,8 \pm 0,97 \mu\text{M}$  A431, és  $8,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$  MCF7). Az új vegyületek (**9–13**) gyulladáscsökkentő hatásvizsgálata során az LPS és TNF- $\alpha$  által indukált IL-8 expresszió gátlás mértékét vizsgáltuk endotélsejteken. Megállapítottuk, hogy mind az 5 vegyület csökkentette az LPS-indukálta IL-8 elválasztást, legaktívabbnak a neurolobatin B (**LOB-14, 10**) és 3-*epi*-dezacetil-izovaleroil-heliangin (**LOB-20, 12**) bizonyult. A vegyületek nem befolyásolták szignifikáns mértékben a TNF- $\alpha$  által indukált IL-8 termelést, szemben a pozitív kontrollként alkalmazott BAY jelzésű anyaggal, amely mindkét esetben csökkentette az IL-8 produkciót.

Vizsgáltuk a növény diklórmétános kivonatának és a növényből izolált ismert vegyületek (**1–8**) proinflammatorikus proteinek (IL-8 és E-szelektin) termelésére gyakorolt hatását endotél és monocita sejteken.  $10 \mu\text{M}$ -os koncentrációban valamennyi vegyület (**1–8**) erősen gátolta az IL-8 szekrécióját LPS-stimulált endotélsejteken. A legerősebb aktivitást mutató neurolenin B (**LOB-3, 2**), lobatin B (**LOB-11, 7**) és 8 $\beta$ -izovaleriloxi-9 $\alpha$ -acetoxi-kalikulatolid (**LOB-9, 5**) TNF- $\alpha$  indukálta endotélsejtek IL-8 termelését is gátolták. A kivonat és a vegyületek mind az LPS, mind a TNF- $\alpha$  vizsgálat során szignifikáns mértékben csökkentették egy másik gyulladásos marker, az adhézión molekula E-szelektin elválasztását  $5 \mu\text{g/mL}$  illetve  $5 \mu\text{M}$  koncentrációban. A legaktívabb szeszkviterpének [**LOB-3 (2)**, **LOB-9 (5)** és **LOB-11 (7)**] IL-8 és E-szelektin mRNS génexpressziót gátló hatását endotélsejteken teszteltük. A vegyületek erősen gátolták mindkét proinflammatorikus protein relatív mRNS expresszióját.

A lobatin B (**LOB-11, 7**) mutatta a legjelentősebb gyulladáscsökkentő hatást. A vegyület hatása összemérhető az ismert NF- $\kappa\text{B}$  inhibitor BAY illetve a partenolid aktivitásával. Ezt követte a 8 $\beta$ -izovaleriloxi-9 $\alpha$ -acetoxi-kalikulatolid (**LOB-9, 5**), a neurolenin B (**LOB-3, 2**) és a lobatin A (**LOB-10, 6**). A szerkezet-hatás vizsgálataink eredményeként megállapítottuk, hogy a gyulladáscsökkentő hatás szempontjából fontos a molekulában a C-4–C-5 és C-2–C-3 helyzetű kettős kötés és a C-9-es helyzetű acetil-csoport jelenléte.

Végül vizsgáltuk a diklórmétános kivonat *in vivo* gyulladáscsökkentő hatását patkány lábödéma teszten  $20$  és  $60 \text{ mg/kg}$  koncentrációban. Pozitív kontrollként dexametazont ( $0,5 \text{ mg/kg}$ ) alkalmaztunk. Mindkét alkalmazott dózis szignifikáns mértékben csökkentette a lokális ödéma méretét, a magasabb dózis esetén  $50\%$ -ot meghaladó gátlást tapasztaltunk.

### ***Onopordum acanthium***

Az *O. acanthium* föld feletti részéből azonosított vegyületek (**14–20**), valamint a növény gyökeréből korábban izolált tiszta anyagok [4 $\beta$ ,15-dihidro-3-dehidrozaluzanin C (**25**), zaluzanin C (**26**), 4 $\beta$ ,15,11 $\beta$ ,13-tetrahidrozaluzanin C (**27**), nitidanin-diizovalerianát (**28**), 24-metilénkoleszterol (**29**) és 13-oxo-9Z,11E-oktadekadiénsav (**30**)], *in vitro* gyulladáscsökkentő hatását COX-2 és NF- $\kappa\text{B}$

gén expresszió, valamint iNOS, 5-LOX, COX-1 és COX-2 enzimek gátlásán alapuló teszteken értékeltük. Az izolált flavanoidok közül a hiszpidulin (**OPD-2, 17**), nepetin (**OPD-3, 18**) és a luteolin (**OPD-4, 19**) mutatott 50 %-ot meghaladó gátló hatást. A luteolin (**19**) az 5-LOX enzim gátlásában ( $74,6 \pm 8,8$  %) bizonyult a leghatásosabbnak. A lignánok (**14–16**) esetén csak mérsékelt gátló hatást tapasztaltunk. Két SL, a 4 $\beta$ ,15-dihidro-3-dehidrozaluzanin C (**25**) és a zaluzanin C (**26**), erős COX-2 ( $98,6 \pm 0,2\%$  és  $97,0 \pm 1,1\%$ ) és NF- $\kappa$ B1 génexpresszió ( $78,7 \pm 7,3\%$  és  $69,9 \pm 3,4\%$ ), valamint NO ( $100,4 \pm 0,5\%$  és  $99,4 \pm 0,8\%$ ) gátló aktivitást mutatott 20  $\mu$ M koncentrációban. A 4 $\beta$ ,15-dihidro-3-dehidrozaluzanin C (**25**) és a zaluzanin C (**26**) esetében elsőként vizsgáltuk a COX-2 és NF- $\kappa$ B1 génexpresszió gátló aktivitást THP-1 sejteken. Annak érdekében, hogy megállapítsuk vajon az aktív komponensek (**25–26**) génexpresszió gátlása a direkt toxikus hatás miatt alakul-e ki XTT teszt segítségével vizsgáltuk azok citotoxicitását különböző időpontokban és különböző koncentrációkban. Megállapítottuk, hogy a vegyületek (**25–26**) nem vagy csak alacsony citotoxicitást mutattak a tesztelt koncentrációban.

### ***Polygonum persicaria***

A *P. persicaria* kloroformos kivonata magas GIRK gátló aktivitást mutatott, hatása összemérhető a referencia anyagként használt propafenonéval. A kivonat leghatásosabb frakciójából (B/4 és B/5) flavonoidokat (**21–24**) izoláltunk és teszteltük azok GIRK gátló aktivitását. Meglepődve tapasztaltuk, hogy a vegyületek (**21–24**) és azok keverékei elhanyagolható mértékű K<sup>+</sup> ioncsatorna gátlást mutatnak. Viszont, a B/4 és B/5 frakció minoranyagokat tartalmazó HPLC eluátumai esetén jelentős GIRK gátló aktivitást ( $63 \pm 9\%$  és  $62 \pm 4\%$  0,1 mg/mL koncentrációnál) figyeltünk meg. Mivel ezek az anyagok nagyon alacsony koncentrációban vannak jelen a kivonatban izolálásukra újabb, méretnövelt kísérleteket tervezünk.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az Asteraceae és Polygonaceae fajok másodlagos anyagcseretermékei gyógyszerfejlesztések új modellanyagaiként szolgálhatnak, figyelembe véve jelentős farmakológia potenciáljukat és különösen a kiemelkedő gyulladáscsökkentő és tumorelles aktivitásukat.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet és nagyrabecsülésemet fejezem ki témavezetőimnek, *Prof. Dr. Hohmann Judit*nak (a Farmakognóziai Intézet vezetőjének) és *Dr. Vasas Andreának* munkám folyamatos irányításáért, szakmai tanácsaikért, az Intézetben eltöltött idő folyamán irányomban tanúsított emberségükért, kifogyhatatlan optimizmusukért és az értekezés megírásában nyújtott segítségükért.

Összinte köszönetem fejezem ki *Dr. Zupkó Istvánnak* és *Dr. Molnár Judit*nak az antiprolifaretív, *Dr. Tálosi Lászlónak*, *Orvos Péternek* és *Bánsághi Szávának* a GIRK csatorna, *Prof. Brigitte Koppnak*, *Prof. Georg Krupitzanak*, *Prof. Rainer de Martinnak*, *Marcus Bindernek*, *Dr. Ruxandra McKinnonnak*, *Dr. Valery N. Bochkovnak*, *Taras Afonyushkinnek*, *Christine Ungernak*, *Dr. Helmut Dolznignek*, *Rene Diaznak*, *Prof. Rudolf Bauernek*, *San-Po Pannak*, *Stefanie Niklesnek* és *Sabine Ortmann-nak* a gyulladáscsökkentő vizsgálatok elvégzéséért.

Hálás vagyok *Dr. Jakab Gusztávnak*, *Dr. Balogh Lajosnak*, *Dr. Rédei Tamásnak* és *Dr. Richard Frischnek* a növények begyűjtésért és azonosításáért; *Dr. Forgó Péternek*, *Dr. Béni Zoltánnak*, *Dr. Háda Viktor*nak és *Dr. Jedlinszki Nikolettának* az NMR és MS mérésekért.

Köszönöm a Farmakognóziai Intézet valamennyi munkatársának munkámhoz nyújtott segítségét. Külön köszönöm *Hadárné Berta Erzsébet* és *Herkéné Nagy Anna* segítségét a laboratóriumi munkában. Köszönet illeti kollégáimat, *Dr. Rédei Dórát*, *Dr. Veres Katalint*, *Dr. Csupor Dezsőt*, *Dr. Csupor-Löffler Boglárkát* és *Dr. Ványolós Attilát*, akik mindig készek voltak tanácsaikkal, támogatásukkal munkámat segíteni.

Köszönettel tartozom az *Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok* (OTKA PD101432 és K109846) anyagi támogatásáért.

Szeretném megköszönni barátaimnak, *Dr. Roza Orsolyának* és *Horváth-Boros Klárának* támogatásukat és tanácsaikat. Segítségük nélkül a disszertációm nem született volna meg.

Végül köszönöm kedvesemnek, Ádámnak és családomnak a szerető támogatást és gondoskodást, amely mindig biztos háttérül szolgált a munka elvégzése során.



#### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK:

1. **Lajter I**, Zupkó I, Molnár J, Jakab G, Balogh L, Vasas A, Hohmann J.  
Antiproliferative activity of Polygonaceae species from the Carpathian Basin against human cancer cell lines  
*Phytother Research* 2013; **27**: 77-85. If: 2.397
2. **Lajter I**, Vasas A, Orvos P, Rédei D, Bánsághi S, Tálosi L, Jakab G, Béni Z, Háda V, Forgo P, Hohmann J.  
Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by extracts of *Polygonum persicaria* and isolation of new flavonoids from the chloroform extract of the herb  
*Planta Medica* 2013; **79**: 1736-1741. If: 2.339
3. **Lajter I**, Vasas A, Béni Z, Forgo P, Binder M, Bochkov V, Zupkó I, Krupitza G, Frisch R, Kopp B, Hohmann J.  
Sesquiterpenes from *Neurolaena lobata* and their antiproliferative and anti-inflammatory activities  
*Journal of Natural Products* 2014; **77**: 576-582. If: 3.798
4. McKinnon R, Binder M, Zupkó I, Afonyushkin T, **Lajter I**, Vasas A, de Martin R, Unger C, Dolznig H; Diaz R, Frisch R, Passreiter CM, Krupitza G, Hohmann J, Kopp B, Bochkov VN.  
Pharmacological insight into the anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass.  
*Phytomedicine* 2014; **21**: 1695-1701. If: 3.126
5. **Lajter I**, Pan SP, Nikles S, Ortmann S, Vasas A, Csopor-Löffler B, Forgó P, Hohmann J, Bauer R.  
Inhibition of COX-2 and NF-κB1 gene expression, NO production, leukotriene biosynthesis, and, COX-1 and COX-2 enzymes by extracts and constituents of *Onopordum acanthium*  
*Planta Medica* 2015; **81**: 1270-1276. If: 2.152\*

#### EGYÉB KÖZLEMÉNYEK:

1. Kiss I, Unger C, Chi Nguyen H, Atanasov AG, Kramer N, Chatuphonprasert W, Brenner S, McKinnon R, Peschel A, Vasas A, **Lajter I**, Kain R, Saiko P, Szekeres T, Kenner L, Hassler MR, Diaz R, Frisch R, Dirsch VM, Jäger W, de Martin R, Bochkov VN, Passreiter CM, Peter-Vörösmarty B, Mader RM, Grusch M, Dolznig H, Kopp B, Zupko I, Hohmann J, Krupitza G.  
Lobatin B inhibits NPM/ALK and NF-κB attenuating anaplastic-large-cell-lymphomagenesis and lymphendothelial tumour intravasation  
*Cancer Lett.* 2015; **356**: 994-1006. If: 5.621\*
2. Orbán-Gyapai O, **Lajter I**, Hohmann J, Jakab G, Vasas A.  
Xanthine oxidase-inhibitory activity of extracts prepared from Polygonaceae species  
*Phytotherapy Res.* 2015; **29**: 459-465. If: 2.660\*
3. Unger C, Kiss I, Vasas A, **Lajter I**, Kramer N, Atanasov AG, Nguyen CH, Chatuphonprasert W, Brenner S, Krieger S, McKinnon R, Peschel A, Kain R, Saiko P, Szekeres T, Kenner L, Hassler MR, Diaz R, Frisch R, Dirsch VM, Jäger W, de Martin R, Bochkov VN, Passreiter CM, Peter-Vörösmarty B, Mader RM, Grusch M, Dolznig H, Kopp B, Zupko I, Hohmann J, Krupitza G.  
The germacranolide sesquiterpene lactone neuroleolin B of the medicinal plant *Neurolaena lobata* (L.) R.Br. ex Cass inhibits NPM/ALK-driven cell expansion and NF-κB-driven tumour intravasation  
*Phytomedicine* 2015; **22**: 862-874. If: 3.126\*

\*2014. évi számítás alapján

#### ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK:

1. **Lajter I**, Zupkó I, Molnár J, Jakab G, Balogh L, Hohmann J.  
Kárpát-medencében honos Polygonaceae fajok antiproliferatív hatásának vizsgálata tumor sejteken *in vitro*  
XII. Magyar Gyógynövény Konferencia; Szeged, 2011. május 5-7.
2. **Lajter I**.  
A Polygonaceae növénycsalád kárpát-medencei fajainak antiproliferatív szűrővizsgálata tumorsejteken  
„ÉLETFOLYAMATOK ÉS SZABÁLYOZÁSUK” A Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi, Gyógyszertudományi és Fogorvostudományi Karai Doktori Iskolájának tudományos konferenciája; Szeged, 2011. november 18.
3. **Lajter I**, Csupor-Löffler B, Zupkó I, Vasas A, Hohmann J.  
Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Onopordum acanthium*  
8<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products; Lublin, Lengyelország, 2012. május 17-20.
4. **Lajter I**, Zupkó I, Molnár J, Jakab G, Balogh L, Hohmann J.  
Kárpát-medencében honos Polygonaceae fajok antiproliferatív hatásának vizsgálata tumor sejteken *in vitro*  
Molekulától a gyógyszerekig; Szeged, 2012. május 24-25.
5. **Lajter I**.  
Új flavanoidok izolálása a *Persicaria maculosa* (Gray) herbából  
Ünnepi Előadóiülés Máthé Imre 70. születésnapja alkalmából; Szeged, 2012. június 15.
6. **Lajter I**, Csupor-Löffler B, Orbán-Gyapai O, Jedlinszki N, Forgó P, Zupkó I, Vasas A, Hohmann J.  
Bioactivity-guided isolation of compounds with xanthine oxidase inhibitory activity from *Onopordum acanthium*  
Phytokongressz 2013; Lipcse, Németország, 2013. március 8-10.
7. Molnár J, **Lajter I**, Hajdú Z, Szekeres T, Saiko P, Hohmann J, Zupkó I.  
Investigation of the antiproliferative effect of natural sesquiterpene lactones on human cancer cell lines  
Society for Endocrinology BES 2013; Harrogate, Anglia, 2013. március 18-21.
8. **Lajter I**, Vasas A, Orvos P, Tálosi L, Forgó P, Béni Z, Hohmann J.  
Inhibition of GIRK channels by extract of *Polygonum persicaria* and isolation of new flavonoids  
61<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA2013; Münster, Németország, 2013. szeptember 1-5.
9. Pan SP, **Lajter I**, Vasas A, Bauer R, Hohmann J.  
Inhibition of COX-2 and NFκB1 expression in THP-1 cells by sesquiterpene lactones from *Onopordum acanthium*  
3<sup>rd</sup> Pharma DocDay; Graz, Ausztria, 2014. január 30.
10. **Lajter I**, Pan SP, Ortmann S, Csupor-Löffler B, Forgó P, Vasas A, Bauer R, Hohmann J.  
Az *Onopordum acanthium* gyulladáscsökkentő hatását vegyületeinek izolálása  
Fiatl Gyógynövénykutatók Fóruma; Budakalász, 2014. február 14.

11. **Lajter I**, Vasas A, Béni Z, Forgó P, Hohmann J.  
Új szeszkviterpén-laktonok izolálása és szerkezet-meghatározása a *Neurolaena lobatából*  
Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV.; Budapest, 2014. április 10-12.
12. **Lajter I**, Pan SP, Vasas A, Forgó P, Hohmann J, Bauer R.  
Anti-inflammatory activity of *Onopordum acanthium* extracts and isolated compounds  
62<sup>nd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural  
Product Research – GA2014; Guimaraes, Portugália, 2014. augusztus 31-szeptember 4.
13. **Lajter I**, Vasas A, Béni Z, Forgó P, Binder M, Bochkov V, Zupkó I, Krupitza G, Frish R, Kopp B,  
Hohmann J.  
Isolation and characterisation of new bioactive compounds from *Neurolaena lobata*  
22<sup>nd</sup> Conference on Isoprenoids; Prága, Csehország, 2014. szeptember 7-10.
14. Vasas A, **Lajter I**, Béni Z, Forgó P, Zupkó I, Krupitza G, Hohmann J.  
Biológiaiailag aktív szeszkviterpének izolálása a *Neurolaena lobatából*  
MTA Szteroid és Terpenoidkémiai Munkabizottság és az MTA SZAB Szerves és  
Gyógyszerkémiai Munkabizottság közös rendezvénye; Szeged, 2014. október 31.
15. **Lajter I**, Vasas A, Forgó P, Kúsz N, Zupkó I, Krupitza G, Hohmann J.  
Egy maja gyógynövény, a *Neurolaena lobata* fitokémiai és farmakológiai vizsgálata  
XIV. Magyar Gyógynövény Konferencia, Pannonhalma, 2015. május 29-30.
16. **Lajter I**, Vasas A, Forgó P, Krupitza G, Frisch R, Hohmann J.  
New sesquiterpenes from *Neurolaena lobata*  
63<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural  
Product Research – GA2015; Budapest, 2015. augusztus 23-27.
17. **Lajter I**, Kúsz N, Hohmann J, Vasas A.  
Isolation, characterisation and chemotaxonomic significance of secondary metabolites from  
*Polygonum persicaria* L.  
63<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural  
Product Research – GA2015; Budapest, 2015. augusztus 23-27.